

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP 98/04204

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

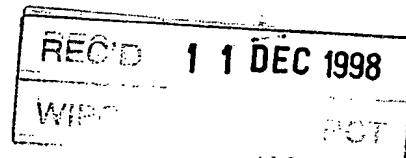
21.10.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 2月27日



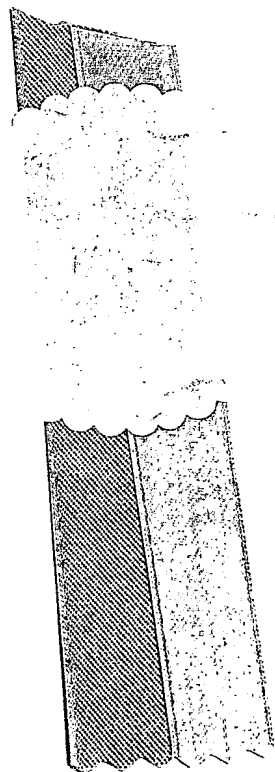
出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第047015号

出 願 人
Applicant(s):

イーライ・リリー・アンド・カンパニー

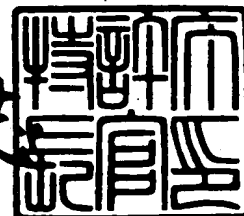
PRIORITY DOCUMENT



1998年11月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3094555

【書類名】 特許願

【整理番号】 158332

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成10年 2月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/51

【発明の名称】 ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性ポリメラーゼ活性を有する組換え型タンパク及びその製造方法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 石川県金沢市大桑町和12-13

 【氏名】 村上 清史

【発明者】

 【住所又は居所】 石川県金沢市若松町街区3番地102

 【氏名】 山下 竜也

【特許出願人】

 【識別番号】 590005922

 【住所又は居所】 アメリカ合衆国46285インディアナ州インディアナポリス市、リリー・コーポレート・センター

 【氏名又は名称】 イーライ・リリー・アンド・カンパニー

 【氏名又は名称原語表記】 ELI LILLY AND COMPANY

 【国籍】 アメリカ合衆国

【代理人】

 【識別番号】 100062144

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

 【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100087114

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 みの里

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712506

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性ポリメラーゼ活性を有する組換え型タンパク及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメラーゼ活性を有する可溶型ポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド以外の第2のポリペプチドをコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地からポリメラーゼ活性を有する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼの製造方法。

【請求項2】 ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメラーゼ活性を有する可溶型ポリペプチドが、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号1から570までの配列、該配列においてアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ上記ポリメラーゼ活性を有するものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 第2のポリペプチドがグルタチオンS-トランスフェラーゼである請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の方法で製造された組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼ。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号1から570までの配列、該配列においてアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと、グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパクであって、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有する組換え型タンパク。

【請求項 6】 請求項 5 記載のタンパクをコードする DNA。

【請求項 7】 請求項 6 記載の DNA を含有する発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C型肝炎ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有する、可溶性の組換え型タンパクに関する。

【0002】

【従来の技術】

C型肝炎ウイルス (HCV) は、非 A 非 B 肝炎の原因ウイルスとして、1989 年にカイロン社 (Chiron) のグループが単離同定した + 鎖 RNA ウイルスである。疫学的調査で、世界的に、HCV 感染人口は約 1% と推定されている。感染経路は輸血等の血液を介するもの以外に重要な経路は未定であり、親子間の垂直感染の寄与は低いと推定されている。Chiron 社が開発した HCV の免疫診断により、輸血による感染の予防は画期的な成果を上げている。

HCV は RNA ウイルスでありながら、長期の持続性感染を肝臓に引き起こし、慢性肝炎の原因になる。約 30 年以上の HCV 慢性肝炎は、引き続く肝細胞がん (肝がん) の主要な原因となっており、日本では全肝がんの少なくとも 75% 以上が HCV 肝炎を背景として発症している。

HCV 関連肝がんは 病態の経過から、発症のリスクが予測できるといわれるほど、一連の経過を経て発がんが見られる。従って、HCV ウイルスの増殖をブロックすることは、HCV による肝炎を軽癒し、肝がん発症の予防に有効であることが期待される。

【0003】

現在、HCV の感染と HCV 増殖阻止を目指して種々の方途が検討されているが、未だ決定的な方法は確立されていない。

まず、ウイルス感染の阻止を目標とした、HCV 表面タンパクを標的とする免疫的研究は、ウイルスの表面タンパクが感染途上で次々と変異を起こす能力を有

するために、所期の効果が上がっておらず、また、HCV感染に必要な宿主側のレセプターの同定も成功していない状況である。

さらに、ウイルスタンパクは一本の長いポリペプチドとして合成され（図1参照）、合成途上で宿主及びHCVの遺伝子がコードするタンパク分解酵素により切断され、ウイルスの構造及び非構造タンパクが産生される。そのタンパク分解酵素のうち、HCV NS2及びNS3がコードするタンパクによるタンパクの切断過程を阻害することを目指したNS2及びNS3に関する研究がなされ、タンパクの構造解析、阻害剤の開発が進んでいる状況であるが、未だ臨床応用には程遠い。

【0004】

HCV増殖過程の研究及びワクチン開発が遅れていた大きい原因は、培養細胞を用いたHCVの感染・増殖系が存在しないことにあるが、近年、チンパンジーを用いた系で感染性のHCV RNAのクローンが同定されたことから、培養細胞のHCV増殖系が確立されれば、弱毒化ウイルスの産生とワクチンの開発、HCV増殖過程の分子機構の解明と増殖阻害剤の開発が急速に進展するものと期待されている。このように、HCV増殖・複製系の開発は、HCV複製過程とその分子機構の解明、ひいてはその増殖の特異性に基づく増殖阻害剤の設計を可能にするものと考えられる。しかしながら、現在、その研究は、その甚大で急を要する需要に直に応えることができない状況にある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記の従来のアプローチとは別に、HCV複製の中心的酵素であるNS5B（図1参照）のRNA依存RNAポリメラーゼ（以下、RdRPという）活性を阻害することによりHCV感染の治療及び予防に役立てることが可能と考えられる。即ち、HCVはRNAウイルスであるが、RNAよりRNAを合成する核酸（遺伝情報）合成過程は宿主には存在しない。従って、RdRPによるHCVの複製過程を特異的に阻害する物質の開発が進められている。しかるに、そのような物質を得るためには、RdRPの機能を研究し、さらには阻害物質を検定するために、多量の精製されたNS5Bタンパクが必要である。その目的には、遺伝子

組換え技術によって、適当な宿主にRdRP活性を有する組換え型NS5Bタンパクを生産させる方法が最適であるが、従来、十分量の精製されたNS5Bを得ることはできなかった。

例えば、De Francescoらは、昆虫細胞で組換え型NS5Bを得、生化学的にRdRP活性を証明したが、阻害剤を検定、開発するのに十分な量の酵素を得ることは成功していない (De Francesco, R., et al., *Methods Enzymol.* 275:58-67, 1996)。また、多くの研究者が大腸菌系で、RdRP活性を有する組換え型NS5Bの発現と大量精製を試みたが、不溶性の標品しか得られず、それを変性し、再生しなければならず、十分量の、生化学的活性を保持するNS5Bタンパクを得ることができなかった (Tan, B.E., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997)。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド以外の第2のポリペプチド（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ：以下、GSTという）をコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地からポリメラーゼ活性を有する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼの製造方法、及びそのようにして製造された可溶型の組換え型RdRP活性を有する融合又は非融合タンパクを提供するものである。

本発明に使用するヒトC型肝炎ウイルスのRdRP由来の可溶型ポリペプチドは、通常、RdRPのアンカー領域の全部又は一部を含むC末端領域を欠失されたものである。

HCVゲノムDNAにおいてヒトC型肝炎ウイルスのNS5BはRdRP活性を有することから、本明細書では、「NS5B」なる語句と、ヒトC型肝炎ウイルスの「RdRP」と同意義に用いる。そして、NS5Bから導かれる、C末端側のアミノ酸が欠失されたRdRP活性を有する可溶型のポリペプチド（タンパ

ク)を、NS5Btと表す。なお、「NS5B」及び「NS5Bt」なる語句は、NS5B及びNS5BtタンパクをコードするDNAを表すこともある。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ（以下、単にRdRPと称する）活性を有するNS5BタンパクのC末端領域にはアンカー領域が存在することを見出し、その役割について検討を加えた結果、C末端領域から一定数のアミノ酸を欠失させ、かつ活性を維持している可溶型タンパク（NS5Bt）と他のポリペプチドとの融合タンパクとして宿主（例えば大腸菌）に発現させると、RdRP活性を有する可溶性の組換え型NS5Btタンパクが得られることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、NS5Bは、アンカー領域の存在によりタンパク精製過程において不溶性分画となるが、アンカー領域を欠失させたNS5Bt変異体は、RdRP活性を維持しつつ、可溶性分画に存在するために、形質転換体から、そのRdRP活性を損なうことなく回収、精製可能となった（試験例2、図9参照）。

このように、本発明方法により、RdRP活性を有する可溶化型の精製組換え型NS5Bタンパクを大量に提供することが、初めて可能となった。

【0008】

HCVタンパクをコードするゲノムについては、cDNAのクローニングもながれており、そのゲノムの構成も明らかにされている。例えば、図1に示すように、HCV-JK1cDNAは、3010のポリタンパク前駆体をコードしており、それは、ウイルス及び宿主のプロテアーゼによりプロセシングされて、少なくとも10個の生成物となる。そして、その最もC末端に位置し、591アミノ酸からなるNS5Bは他のウイルスとの配列比較により、RdRPポリメラーゼをコードすると考えられている（Honda, M., S. Kaneko, M. Unoura, K. Kobayashi, and S. Murakami, 1993, Arch Virol. 128:163-169）。

この、HCV-JK1cDNAの内、591アミノ酸からなるNS5BをコードするDNAの塩基配列及び推定のアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。

【0009】

本明細書の実施例では、RdRP活性を有する組換え型NS5Btを、HCV-JK1cDNAのNS5Bを出発物質として製造しているが、本発明の目的に適う限り、任意のHCV由来のRdRPをコードするNS5Bを用い、本明細書の記載と同様にして活性型組換えNS5Btタンパクを製造することができる。即ち、目的とするHCV由来のNS5Bのアミノ酸配列が既知である場合には、その配列からアンカー領域を特定し、既知でない場合には、常法通り、配列を決定した後、その配列に基づいて、アンカー領域を特定することができる。欠失させるべきアミノ酸の数は、NS5Bの起源であるHCVタンパクに応じて適宜選択される。次いで、アミノ酸配列を決定したNS5BtをコードするDNAを、合成又は適当な手段で得、適当な第2のポリペプチドとの融合タンパクをコードする発現ベクターを構築し、宿主細胞を形質転換し、形質転換体を培養して活性型生成物を回収する。そのような方法は当業者にとって、通常の技術範囲のことである。

【0010】

ここで、第2のポリペプチドとしては、それをコードするDNAと、目的のNS5BtをコードするDNAとを用いて適当な宿主細胞を形質転換したとき、RdRP活性を有する融合タンパクとして発現され、かつRdRP活性になんらの悪影響を及ぼさない限り特に限定されない。しかしながら、第2のポリペプチドは、融合タンパクの精製、回収に好都合な性質を有するものであることが好ましく、さらには、融合タンパクからNS5Btを分離することが可能であれば、さらに好ましい。

そのようなポリペプチドとしては、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）が例示されるが、マルチクローニングサイトを有する発現ベクターの入手の容易性、及びアフィニティー精製が可能である点などからGSTが好ましい。

【0011】

従って、本発明の1つの実施態様では、ヒトC型肝炎ウイルスのRdRP由来の可溶型ポリペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、アミノ酸番号1から570までの配列、又は該配列においてアミノ酸が欠失、置

換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつポリメラーゼ活性を有するものである。

アミノ酸の欠失、置換若しくは付加を導入すべき位置、アミノ酸の種類、数などは、本明細書に開示した配列、及び活性測定法に基づいて、当業者が決定することができる。

本発明の組換え型RdRPは、新規であり、C型肝炎の予防及び治療に有用である。従って、本発明は、該組換え型RdRPをコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターで形質転換された形質転換体を提供するものである。

【0012】

以下、HCV-JK1cDNA由来のNS5BとGSTを例に、本発明を詳しく説明する。

なお、本明細書中では、HCV-JK1cDNA由来のNS5Bタンパク、及びそれから導かれるNS5Btタンパクをいずれも、単にNS5B及びNS5Btと称する。また、NS5BtとグルタチオンSトランスフェラーゼ（以下、GSTと称する）との融合タンパクをGST-NS5Btと称し、本発明方法で製造された組換え型のNS5Btタンパクを、rNS5Bt又はNS5Btと呼称する。さらに、本発明の目的から、「発現ベクター」なる語句と、「発現プラスミド」なる語句を相互変換可能に用いる。

【0013】

既述のごとく、HCV-JK1cDNAは、3010のポリ蛋白前駆体をコードしており、RdRPをコードするNS5Bは、最もC末端側の591アミノ酸からなる（図1）。本発明者らによるHCVゲノムcDNAの解析によれば、配列番号1の591アミノ酸からなるNS5BのC末端部分に非常に疎水性に富む領域（aa570-586（全配列の2989-3005に対応））があり、C末端側の21アミノ酸（配列番号1におけるNo.571-591（2990-3010））付近がアンカー領域と考えられる（図1の中段で陰影を付した部分）。そこで、このアンカー領域部分のアミノ酸が欠失された変異体（NS5Bt）と、GSTとの融合蛋白を遺伝子組換え法で宿主細胞に発現させたところ、極めて効率よくRdRP活性を有する、融合

又は非融合型の、可溶性NS5Bタンパクが得られた。

591アミノ酸からなるNS5B、及びC末端側から一定数のアミノ酸が欠失されたNS5BをコードするDNAは、合成するか、既知のHCV-JK1c DNAから、制限酵素による切断又はPCR法などにより得ることができる。

【0014】

配列番号1に記載のNS5Bから欠失させるべきアミノ酸の数は、C末端の第591位のアミノ酸から、第571までのアミノ酸の領域で、任意の数のアミノ酸を欠失させたポリペプチドが好ましい。そのようなポリペプチドの例として、21アミノ酸を欠失したポリペプチドが挙げられる。

また、本発明の目的には、配列番号1から導かれるC末端欠失ポリペプチド(NS5B)のみならず、所望のRdRP活性を示すことを条件として、該ポリペプチドの、アミノ酸配列におけるRdRP活性を有する変異体も同様に有用である。そのような変異体は、例えば、アミノ酸番号1～570のアミノ酸配列からなるポリペプチドに、アミノ酸の欠失、置換及び／又は挿入を、当業者既知の方法で導入することにより誘導することができる。欠失及び付加は、N及び／又はC末端におけるアミノ酸の欠失及び／または付加を含む。

【0015】

任意の方法で得たNS5BをコードするDNAと第2のポリペプチドであるGSTをコードするDNAとを適当な発現ベクター内で連結して融合タンパクの発現ベクターを構築する。そのような発現ベクターは、予め、NS5BのDNAとGSTのDNAとを連結した後、適当な発現ベクターに挿入するか、あるいは、後述の実施例に記載のごとく、融合タンパクとしてGST及びNS5BをコードするDNAが発現されるように、適当なGSTの発現ベクター〔例、pGENK1 (Murakami, S.ら, 1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123; Yi, M.-K.ら, 1997, Virology 231:119-129) にNS5BのDNAを挿入することにより、構築することができる。後述のプラスミドpGENKSは、プロテインキナーゼAのコンセンサスキナーゼ作用部位 (kination site)、トロンビンの開裂部位及び付加的なマルチクローニングサイト (multiple cloning sites; EcoRI, SacI, KpnI, XmaI, SalI and BamHI) をコードしている。そして、このpGEN

K Sベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の上流には、GSTをコードするDNAが挿入されていることから、本発明の目的に好適である。しかしながら、本発明は、任意の他の発現プラスミドを用いても実施することができる。

【0016】

次いで、得られた発現ベクターで適当な宿主細胞（例、大腸菌）を形質転換し、適当な培地で培養すると、目的の融合タンパクが生産される。得られた融合タンパクの精製は、無細胞抽出液をGlutathion Sepharose 4B カラム（ファルマシア製）に吸着させ、1% Triton X-100含有リン酸緩衝化食塩水（以下、PBS）、次いでDTT含有トリス-塩酸緩衝液で洗浄した後、グルタチオンを含む緩衝液で溶出するなどの方法で行う。後述するように、本発明では、適切な塩濃度の溶出液を用いることにより、高純度のGST-NS5Btを大量に得ることができた。次いで、必要に応じて融合タンパクから非融合型のNS5Btタンパクを分離することができる。

【0017】

以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、これらは本発明を制限するものではない。以下の実施例で用いたプラスミド類、様々な制限酵素やT4 DNAリガーゼ、その他の酵素類は、市販品から入手し、供給者の指示に従って使用した。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主の形質転換、形質転換体の培養及び培養物からの酵素の回収は、当業者既知の方法、あるいは文献記載の方法に準じて行なった。

【0018】

参考例 1 ウェスタンブロッティング

(1) NS5Bに対する抗血清の調製

抗血清は、完全フロイドのアジュバント (Sigma Chemicals Co. Ltd.) 中の、200 μ g の精製細菌性ヘキサヒスチジン-標識NS5Btをウサギに皮下注射することにより、ウサギ内で惹起した。抗血清のIgG画分は、供給者 (Pharmacia LKB Co. Ltd.) の指示に従って、Protein A Sepharoseカラムを用いて精製した。抗血清及び精製IgG画分の両方をウェスタンブロッティングに用いた。

【0019】

(2) ウェスタンブロッティング

試料（大腸菌又は哺乳動物細胞抽出液（リゼイト）から調製）タンパクをSDSサンプルバッファー（62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール）に懸濁し、5分間加熱し、10% SDS-PAGEで分画し、展開液（192 mM グリシン, 25 mM Tris 及び20%メタノール）中のニトロセルロース膜（Schleicher及びSchuell Co. Ltd.）に電気的に移行させる。次いで、抗-NS5Bを用いて、発現された様々な組換えNS5Bタンパク類を常法通りウェスタンブロッティングにより検出する。バンドは、供給者（Amersham社）の指示に従い、ECL（商品名：ECLウェスタンブロッティング検出試薬セット, カタログコードRPN2106P, Amersham社）を用いて観察した。

【0020】

参考例2 ポリメラーゼ活性の測定

NS5B、GST-NS5B t 及び r NS5B t、及びそれを含有する試料のRNA依存性RNAポリメラーゼ活性の測定は、原則として、以下の方法で行った。なお、同時に他のポリメラーゼ活性（逆転写酵素活性、DNA依存性RNAポリメラーゼ活性、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性）及びターミナルトランスフェラーゼ（RT）活性も測定した。

上記活性は、文献（Behrens, S. E.ら, EMBO J. 15:12-22, 1996; De Francesco, R.ら, Methods Enzymol. 275:58-67, 1996; Lama, J.ら, J. Biol.Chem. 270:14430-14438, 1995）に記載の方法に従い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UMP又は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dTMPの取り込みに基づいて評価した。

【0021】

標準的な反応（10 μ l）は、20mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl_2 , 1mM DTT, 1 mM EDTA, 20U RNase inhibitor（和光純薬）, 2 μ Ci $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP（800 Ci/mmol, Amersham Co. Ltd.）, 10 μ M UTP, 10 μ g/ml poly (A) 及びoligo (U) 14を含有するバッファー中で行った。上記反応液に精製NS5B tを加え、25℃で2時間インキュベートした後、サンプルをDE81フィルター（Whatman Co. Ltd.）に移し、反応を止めた。フィルターを、0.5M Na_2HPO_4 (pH7.0) で十

分に洗浄し、70%エタノールでリンス後、風乾した後、最終的にフィルターに結合した放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0022】

2) RdRP活性の測定には、oligo(U)14及び oligo(dT)の両方をプライマーとして用いた。RT活性の測定には、poly(A)、oligo(dT)及び $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ を、それぞれ、テンプレート、プライマー及び基質として用いた。RNAポリメラーゼ活性の測定には、poly(dA)、oligo(U)、及び、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を用いた。大腸菌由来のポリメラーゼの影響の検討のために、リファンピシン (Rifampicin) 及びアクチノマイシンD (シグマ社) をエタノールに溶解し、反応系に加えた。

【0023】

3) RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) アッセイ

RdRP活性は、全量40 μl の反応液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM EDTA, 20U RNase インヒビター (和光純薬), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アクチノマイシンD (Sigma Co. Ltd.), 5 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ 及び各0.5mMの残りのNTP類 (即ち、ATP, CTP及び GTP) と、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAテンプレートとを用いて行った。制限ヌクレオチドの濃度を、10 μM に調節した。精製NS5B tサンプルを添加後、反応混合物を、30℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、等量の2×プロテインナーゼKバッファー (300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS)を加え、50 μg プロテインナーゼK (Boehringer Mannheim Co. Ltd.)で30分間消化することにより、反応を止めた。RNA産物をフェノール-クロロホルム (1:1)で抽出し、エタノール沈殿に付し、8M尿素-8%PAGEで分析した。電気泳動の後、ゲルを乾燥し、イメージングプレート (Imaging plate) に暴露し、BAS 1000 Bioimage アナライザー (Fuji Co. Ltd)で解析した。

【0024】

実施例1 組換え型GST-NS5Bt及びNS5Btの製造

1. プラスミドpGENKSの構築

GST融合型組換えタンパク発現プラスミドpGENKSは、pGENK1 (

Murakami, S.ら, 1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123; Yi, M.-K.ら, 1997, Virology 231:119-129) をEcoRI及びBamHIで消化し、pGENK1EcoRI/BamHIベクターを作成し、以下のマルチクローニング部位をコードする合成オリゴヌクレオチドを挿入した。

SSFor (配列番号16) GAATTCGAGC TCCGGTACCC CCGGGTCGAC GACGGATCC

SSRev (配列番号17) GGATCCGTCG ACCCCGGGGG TACCGGAGCT CCGAATC

上記合成オリゴヌクレオチドをNaCl存在下に65℃でアニーリングし、EcoRI-BamHIで消化し、フェノールクロロホルムで抽出、エタノール沈殿後、トリスEDTA溶液(以下、TE)に溶解し、上記ベクターにライゲーション・ハイ(ligation high; 東洋紡)にて供給者の指示に従い、ライゲーションをした。その後、大腸菌株XL1-Blueに通常の方法により形質転換し、プラスミドpGENKSを作成した。

プラスミドpGENKSはプロテイナーゼAのコンセンサス配列、トロンビン開裂認識部位及びマルチクローニングサイト(EcoRI、SacI、KpnI、XmaI、SalI、BamHI)をコードしており、この上流にGSTをコードするDNA配列がある。このプラスミドpGENKSの制限地図を図2に、構築の模式図を図3に示す。図3において、GST-NS5Bt融合タンパクのトロンビンによる切断箇所は下線で示されている。

【0025】

2. 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は、通常の分子生物学的な方法で行う。プラスミドDNA又はライゲーション反応液を60μlのコンピテント大腸菌に加え、氷上にて30分間インキュベートし、その後、42℃にて約1分間、続いて氷上で2分間インキュベートし、SOC溶液を加え、37℃で45分間培養後、100μg/mlアンピシリン含有LBプレートにプレーティングし、約12から20時間、37℃で培養し、形質転換体を得る。

【0026】

3. GST-NS5Btの発現ベクターpGENKS/NS5Btの構築

(1) NS5BのDNAの調製

NS5Bを含有するHCV JK1のサブゲノムの cDNA (Honda, M.ら, 1993, Arch Virol. 128:163-169) を、タンパク合成開始コドン、人工的 Sac I 及び Sal I 制限部位を有する以下の1組のプライマーを用いてPCR法でサブクローニングした。

GGGAGCTCCA TGTCGATGTCT TACACGTGGAC A (NS5B For) (配列番号2)

GGGTCGACCC GGTGGGGAGC AGGTAGATGCC (NS5B Rev) (配列番号3)

これら2つのプライマー、及びTaqポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq; 宝酒造社製) を用い、供給者の指示に従って、以下の手順でPCRを行った。すなわち、(94℃, 1分; 58℃, 1分; 72℃, 2分) からなる一連の処理を30サイクル行った。

この操作により、約1.7 kbのNS5BのcDNAがPCRにて増幅された。そして、このPCR産物を低融点アガロースゲル電気泳動にかけ、DNAバンドを切り出し、通常のフェノール、クロロホルム、エタノール沈殿を用いて回収した。この回収したcDNAをSac I 及び Sal I 制限酵素 (宝酒造) にて処理し、フェノール、クロロホルム処理、及びエタノール沈殿し、精製後、次の段階に用いた。

【0027】

(2) pGENKS/NS5Bの構築

NS5B全長を発現するプラスミドをまず構築した。pGENKSをSac I 及び Sal I 制限酵素にて処理し、pGENKS Sac I / Sal I ベクターを作成し、(1) で得たNS5B cDNA Sac I / Sal I 断片を、T4 DNAリガーゼのキットであるライゲーション・ハイ (東洋紡) を用い、供給者の指示に従い、ライゲーション反応を行い、大腸菌へ形質転換し、pGENKS/NS5Bを得た。

【0028】

(3) pGENKS/NS5Btの構築

C末端の21アミノ酸が欠失されたNS5Btは、上記(2) で得られたpGENKS/NS5Bを鋳型とし、NS5BForと、次ぎのプライマー (NS5BtRev) :

GGGTCGACGC GGGTCGGGCA CGAGACAGGCT (NS5BtRev) (配列番号4)

を用い、上述と同様の方法でPCR反応を行い、NS5B t cDNAを作成し、同様の方法でpGENKS/NS5B tを得た。

【0029】

(3) 大腸菌形質転換体によるGST-NS5B tの発現とその精製

上記2に記載の方法で大腸菌株を形質転換し、以下の方法で培養し、発現産物を精製した。

精製の様々な段階で試料を採取し、SDS-10%PAGEにより分離し、タンパク濃度を測定した。同時に、参考例1に記載のウェスタンブロッティング（抗NS5B及び抗GST抗体を用いる）で分析した。なお、タンパク濃度は、ブラッドフォード法（Bradford method）又はウシ血清アルブミン（BSA）を標準とするCoomassie 染色法（CBB）で測定した。さらに、様々な精製段階における試料のポリメーゼ活性を、参考例2及び後述の（7）に記載のごとく、UMP取り込みに基づいて検討した。これらの結果は、図4及び表1に記載されている。

1) タンパクを産生する細菌の調製

pGENKS/NS5B tプラスミドで形質転換し、得られた大腸菌株（BL21 pLysS）の1コロニーを、10mlの100 μ g/mlアンピシリン含有LB 培地に懸濁し、30℃で一夜、前培養した。この培養物を100 μ g/mlアンピシリン含有LB 培地1lで希釈し、30℃でOD₆₀₀が0.6から0.7になるまで培養し、これらの培養物に、0.4 mMイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を加え、一夜誘導した。

この培養物1lを遠心し、大腸菌を収穫し、リン酸緩衝化食塩水（PBS）で一回洗浄した。次いで、このペレットを1mMジチオスレイトール（DTT）及び1% Triton X-100 含有PBS（以下、バッファA）32mlに懸濁した。

【0030】

2) 超音波処理

懸濁液を氷上で、粘性が無くなるまで超音波処理し、15,000gで20分間遠心した。上清1（S1）とペレットを分離し、上清（S1）を氷上に放置した。ペレットを1.0M NaClを含有するバッファA 32mlに懸濁し、懸濁液を同様

に超音波処理し、遠心した上清を集め (S2)、上記のS1と混合し、バッファ-AでNaCl濃度を0.33Mに調節し、上清3 (S3)を得た。

3) DEAE Sephacelによる精製

S3をバッファ-Aで平衡化したDEAE Sephacelカラムに通し、通過後の分画を得た。

【0031】

4) グルタチオンセファロース4Bカラムによる精製

上記3)で得た画分を、バッファ-A中で平衡化した、グルタチオンセファロース4Bビーズ (glutathione Sepharose 4B beads; Pharmacia Biotech Co. Ltd.) 1mlと混合し、4℃で1時間、タンパク質をビーズに吸収させた。次いで、このビーズを、バッファ-A、次いで1mM DTT含有50mM Tris-HCl (pH 8.0)で完全に洗浄し、溶出バッファ [50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM グルタチオン、10mM DTT及び0.1% Triton X-100] 4mlで溶出した後、500mM NaClを含有する溶出バッファ4mlで溶出した (図4Aレーン4)。

【0032】

5) ヘパリンセファロースカラムによる精製

次いで、溶出液のNaCl濃度を150mMに調節した後、150mM NaCl含有溶出バッファで平衡化したヘパリンセファロースカラム (Pharmacia Biotech Co. Ltd.)に適用した。150mM NaClを含むLGバッファで洗浄した後、カラムをNaCl濃度が100mM~1MのLGバッファ [20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 5mM DTT, 20% グリセロール, 0.5% Triton X-100]で溶出し、それぞれの分画に分離した。

溶出液を10% SDS-PAGEで分析した結果、GST-NS5Btは500mM~900mMの広いNaCl濃度範囲で溶出していた。

【0033】

6) poly (U) セファロースカラムによる精製

上記5)で得た画分を集め、LGバッファでNaCl濃度を150mMに調節した。次いで、この溶液を150mM NaCl含有LGバッファで平衡化したpoly(U)セファロースカラム (Pharmacia Biotech Co. Ltd.)に適用した。

150 mM NaClを含むLGバッファーで洗浄した後、カラムを200 mM～1 MのNaClを含有するLGバッファーで溶出した。5)と同様10% SDS-PAGEで分析した結果、GST-NS5Btは、NaCl濃度500 mM～700 mMの範囲に溶出された。この画分を集め、150 mM NaCl含有LGバッファーに対して透析した(図4 Aレーン5)。

【0034】

(5) 非-融合型rNS5Btの精製

上記(4)、4)において調製した、グルタチオン樹脂に結合したGST-NS5Btをトロンピンで処理してGSTとの結合部位にある人工的なコンセンサス配列(図3の下線部分)で切断した。即ち、GST-NS5Btが結合したグルタチオンビーズ(グルタチオンセファロース4Bビーズ)を、トロンピン開裂バッファー((50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1% Triton X-100)で十分に洗浄した。次いで、トロンピン(50 U)(Pharmacia Biotech Co. Ltd.)を含有するトロンピン開裂バッファーを用いて、4℃で一夜、処理することにより、GSTキャリアーから、GSTと融合したNS5Btタンパクを遊離させた。ビーズを遠心し、NS5Btタンパクを含有する上清を150 mM NaClを含有するLGバッファーに対して透析し、得られた試料を、タンパク濃度の測定及びウエスタンブロッティングにより分析した(図4 A、レーン6)。さらに、ポリメラーゼ活性も測定した。

【0035】

(6) 精製の効果

各精製工程での精製度の変化を図4に、ポリメラーゼ活性の変化を表1に示す。図4において、Aは試料をSDS-10%PAGEにより分離し、Coomassie染色法(CBB)で染色した結果の模写図である。レーン1は全細胞抽出液(lysate);レーン2は超音波処理物の遠心上清;レーン3はDEAE Sephacelに通した後の無細胞抽出液;レーン4はグルタチオンセファロース4Bカラムからの溶出液;レーン5はpoly(U) Sepharoseカラムからの溶出液;レーン6はトロンピン処理後の非-融合型rNS5Btを表す。Bはこれら6つの精製段階の試料を、抗NS5B抗体を用いるウエスタンブロッティング、Cは抗GST

抗体を用いるウエスタンブロッティングの結果の模写図である。

【0036】

図4 Aレーン5に示すように、95 kDaの組換えGST-NS5Btタンパクが純度90%以上で得られた。

また、この95 kDaのバンドをウエスタンブロッティングで分析したところ、ウサギ抗NS5Bt IgG及び抗-GST IgGの両者によって特異的に認識されたことから、組換えGST-NS5Btであることが確認された(図4 B及びC)。

図4 Aのレーン6には、トロンピン消化物の非-結合画分の約63 kDaのタンパクに相当する位置に2重バンドが観察される。このバンドは、ウエスタンブロッティングにおいて、抗-NS5Bt IgGにより特異的に認識されるが、抗-GST IgGには認識されないことから、非-融合型のrNS5Btタンパクであることが確認された(図4 B及びC)。

【0037】

また、表1から、精製GST-NS5BtのUMP取り込みが検出され、相対活性は少なくとも10,000 倍以上であることが分かる。トロンピン切断非-融合NS5Btは、融合タンパクよりもやや低いが、UMP取り込み活性を示した。

最終的に精製された、融合タンパク(GST-NS5Bt)及び非-融合タンパク(NS5Bt)タンパクは150 mM NaCl含有LG-バッファーに対して十分に透析し、-80℃で保存した。

【0038】

(7) ポリメラーゼ活性の検出

上記(6)で精製した純度90%以上の精製GST-NS5Btのポリメラーゼ活性は、参考例2に記載の方法に従って分析した。即ち、基質としての $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UMP又は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dTMPの取り込みを、精製GST-NS5Bt(90 ng)を用いて測定した。結果を、図5に示す。図中、Aは、poly(A)又はpoly(dA)をテンプレートとし、oligo(U)14又はoligo(dT)をプライマーとして用いた場合の基質特異性を示している。Bは25℃及び37℃での反応のタイムコースである。CはGST-NS5Btの量と、UMP取り込みとの関係を示

す。

図5から、明らかに、UMP取り込みは、量依存性に増加する。

アッセイにおけるPoly(A)依存性のUMP取り込みは、oligo(U)プライマーを用いた場合の方が、oligo(dT)プライマーを用いた場合よりもはるかに高い(約2倍)(図5A)。また、精製GST-NS5Bは、試験した条件下で、逆転写酵素活性、DNA依存性RNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼ活性のいずれも、示さなかった。(図5A)。

取り込みは、25℃で、少なくとも4時間継続した。しかし、37℃では速度が低く、2時間継続した時点で一定になった(図5B)。

【0039】

表1 HCV RNAポリメラーゼの精製

【表1】

精製段階	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	取り込み* (cpm)	比活性**	相対活性***
全細胞リゼイト	18000	1319 \pm 230	0.0009	1
超音波処理上清	6000	1485 \pm 82	0.003	3.4
DEAE通過	5900	1558 \pm 53	0.003	3.6
グルタチオン溶出	350	12462 \pm 2281	0.44	485
Poly(U)カラム	90	67740 \pm 1413	9.41	10271
トロンビン開裂	280	47280 \pm 3771	2.11	2344

* : [α - ^{32}P] UMPの反応への取り込み

** : pmole/ μ g/時

***: 全細胞抽出液の取り込みを標準とする。

【0040】

また、ポリメラーゼ活性に及ぼす様々な因子の影響を調べた。結果は図6、7及び表2、3に示されている。

表2に示すように、UMP取り込みはGST単独の場合には観察されないことが分かる。さらに、プライマー又はテンプレートなしでも、UMP取り込みは観察されず、NS5Bタンパクが、ターミナルトランスフェラーゼ活性を持たないことが分る（表2）。これは、昆虫細胞で発現されたNS5Bの活性と異なる性質である。

また、NS5Bは、20 μ g/mlリファンピシン又は 50 μ g/mlのアクチノマイシンDの存在下では、阻害されず、それぞれの200 μ g/ml及び500 μ g/mlまで濃度を増加した場合でも阻害されなかった（表2）。

【0041】

表2 GST-NS5BにおけるRdRP活性のまとめ

【表2】

	UMP取り込み(cpm)	%活性
完全	99448±2170	100
-ブライマー [oligo(U)]	1124±88	1.12
-テンプレート [poly(A)]	2429±1142	2.43
-ブライマー、テンプレート	1521±299	1.52
Rifampicin (20 µg/ml)*	25175±4628	105
Actinomycin D (50 µg/ml)*	23894±5467	100
-Mg ²⁺	738±94	0.74
GST	423±14	0.42
-タンパク	1241±242	1.24

* : コントロールは等量のエタノールを含有含有している。

【0042】

様々な条件下での精製GST-NS5BtのUMP取り込みに基づくRdRP活性を調べた。反応は、GST-NS5Bt (30~45 ng) を用いた。至適pHの検討は、リン酸ナトリウムバッファー中、25℃で2時間インキュベートして行った。結果を図6及び7に示す。

図6において、AはpH、Bは温度、CはKCl濃度、図7において、Dは Mg^{2+} イオン、Eは Zn^{2+} 濃度 (0、10、25及び50 μM) を変化させた場合のUMP取り込みを示す。結果は以下の通りである。

- 1) UMP取り込みの至適pHは広く、中性付近である (図6A)。
- 2) UMP取り込みは、30℃で最も効果的である (図6B)。
- 3) UMP取り込みは、100 mM KCl以上のKCl濃度により阻害され、 Mg^{2+} イオンに厳密に依存しており、 Mg^{2+} の至適濃度は2.5~5 mMの範囲である (図7D)。
- 4) Zn^{2+} 等の他の2価イオンはUMP取り込み活性になんら影響しない (図7E)。

また、界面活性剤の影響を調べた結果、イオン性界面活性剤 (0.01% Sarkosyl又はSDS) は、活性を完全に阻害したが、0.1% までの非イオン性界面活性剤 (例、Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 及び CHAPS) は、殆ど影響しないことが分かった (表3)。

【0043】

表3 活性に対する界面活性剤の影響

【表3】

界面活性剤 **	0.01%	0.1%	1%
Triton X-100	90.8	89.2	61.8
Nonidet P-40	97.2	98.7	63.1
Tween 20	104.5	121.0	118.9
Tauro DOC	81.2	12.6	12.6
SDS	4.6	4.1	5.0
Sarcosyl	28.8	7.5	3.6
CHAPS ***	83.2	85.6	100.8

* : 標準反応（界面活性剤不含）での活性（25755cpm）を100%とする。

** : 最終濃度（v / v）

*** : CHAPS濃度はそれぞれ、0.1 mM、1 mM及び10 mM。

【0044】

（8）HCV RNAをテンプレート及びプライマーとするRNA合成アッセイ
 上記（7）のUMP取り込み試験では合成のテンプレートとプライマーとを使用した
 が、GST-NS5BtがHCV RNAをテンプレート及びプライマーとして使用し得るか否かを検討した。反応は、上記のRNAポリメラーゼアッセ

イと同様の反応液を用い、30℃で2時間の条件で行った。

HCVの3'UTR（これは、複製開始部位として機能すべき部位）を図8Aに示すように、3つの領域に分割した。5BBgは、NS5BのBglII部位から3'UTRまでの領域；poly(U)はpoly(U)ストレッチ；そして3'XはHCVゲノムRNAの3'末端における高度に保存された配列であり、ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが示唆されている3'Xを含有している（Kolykhalov, A. A.ら、J Virol. 70:3363-3371,1996；Tanaka, T.ら、J Virol. 70:3307-3312,1996）。これらの各種のHCVサブゲノムRNAをインビトロ転写で合成し、RNA合成アッセイに用いた（図8A参照）。

【0045】

1) テンプレートの作成

RNAテンプレートを調製するために、各種のプラスミド（pGEM3zf(+)/NS5BBg、pGEM3zf(+)/poly(U)、及びpGEM3zf(+)/3'X）を構築し、インビトロ転写によりRNAテンプレートを調製した。これらのプラスミドは、下記の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRで構築した。

pGEM3zf(+)/NS5BBgは、プライマー：

GCGGATCCAG ATCTACGGGGC CACTTA (5BBgFor) (配列番号5)

GCGAATTCAA GACAAAGGGAA TGGCCTAT (5BBgRev) (配列番号6)

（これらは、それぞれ、合成のBamHI及びEcoRI部位を有する）を用い、EcoRI及びBamHI部位の間にHCV JK-1 cDNAを含有しているpGEM3zf(+)/HCV JK-1をテンプレートとするPCRで構築した。

【0046】

pGEM3zf(+)/poly(U)は、オリゴヌクレオチド：

GCGAATTCGA AGACTTCCCTT TTTTTTGT TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT

TTTCTTTTTT TTCCTTTTTT TTTTTCT (polyUFor) (配列番号7)

GCGGATCCGA AGACGCCACCA AAGAAGGAAAA GGGAAAAAAAAA AAAACAAAGAA

GAAGAAAAAA AAAAGGAAAAA AAAAGA (polyURev) (配列番号8)

（これらは、それぞれ、合成のEcoRI、BamHI及びBbsI部位を有する）をアニーリングしてPCRクローニングに供し、HCVのpoly(U)ストレッチを含

有するフラグメントを得、このDNA断片をpGEM3zf(+) (Promega Co. Ltd.) EcoRI and BamHI ベクターに挿入することにより構築した。

pGEM3zf(+)/3' Xは、1組のオリゴヌクレオチド：

GCGAATTCGA AGACTTGGTGG CTCCATCTTAG CCCTAGTCACG GCTAGCTGTGA

AAGGTCCGTG AGCCGCATGAC TGCAG (3' X For) (配列番号9)

GCGGATCCCT TAAGACATGAT CTGCAGAGAGG CCAGTATCAGC ACTCTCTGCAG

TCATGCGGCT CAC (3' X Rev) (配列番号10)

(これらは、それぞれ、合成のEcoRI、BbsI、AflIII及びBamHIする)をアニーリングしてPCRクローニングに供し、3' X (Kolykhalov, A. A.ら, 1996, J Virol. 70:3363-3371; Tanaka, T.ら, 1996, J Virol. 70:3307-3312)を含むフラグメントを得、EcoRI及びBamHI部位を有するDNA断片をpGEM3zf(+) (Promega Co. Ltd.) EcoRI and BamHI ベクターに挿入することにより構築した。

全構築物をTaq sequencing kitsとDNA sequencer (374A, Applied Biosystems Co. Ltd.)で配列を確認した。

【0047】

2) テンプレートの作成

上記のプラスミドpGEM3zf(+)/5BBg、pGEM3zf(+)/poly(U)、及びpGEM3zf(+)/3' Xを、BamHI又はEcoRIにより消化し、線状化した。一方、後述の試験例1に記載の方法で構築したpNKF LAGをBglIIで消化し、コントロールRNAの作成に用いた。

これらのテンプレートを用いる試験管内転写は、T7 RNAポリメラーゼ又はSP6 RNAポリメラーゼ (Promega Co. Ltd.)を用い、供給者の指示に従って行った。

インキュベーションの後、DNAテンプレートをRNase不含-DNaseで消化した。RNA生成物をフェノールクロロホルム(1:1)で抽出し、Sephadex G-50カラム (Pharmacia Biotech Co., Ltd.)を通して遊離のヌクレオチドを除去した後、エタノール沈殿に付した。RNAの濃度を分光光度法により測定し、RNase除去蒸留水にて1 μ g/ μ lに調節し、-20℃で保存した。

RNAサンプルの品質は、MOPS 変性ゲル又は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動によって確認した。

【0048】

参考例2、3)の記載に準じて、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)アッセイを行った。RNA生成物は、プロテイナーゼK処理後、フェノールクロロホルムによる抽出の後、エタノール沈殿、及び最後に8M尿素含有8%PAGEで分離、精製した。なお、各RNAのサイズは図8Aに記載の通りである。

結果を図8Bに示す。入力したRNAよりもやや大きい、新しい、放射性-標識バンドが検出された(図8B、レーン1、3、4)。

【0049】

本発明のGST-NS5BtによるRNA合成は、4種のリボヌクレオチド全てを基質として必要とし、UTP又はCTP単独を基質として用いた場合には、取り込みは検出されなかった。HCV RNA及びコントロールRNAは、テンプレート及びプライマーとして作用した(図8)。HCV 3' UTRの3' Xを用いるRNA合成能は、他のRNAに比較してやや低く(図8、レーン1及び4と、3とを比較)、HCV 3' UTRのpoly(U) ストレッチはそれ自体では、テンプレート及びプライマーとして作用しなかった(図8、レーン2)。これらの結果は、RNAがテンプレート及びプライマーとして利用されること、及び、UMP取り込みアッセイで示されたように、GST-NS5Btがターミナルトランスフェラーゼ活性を持たないことを示している。

【0050】

以上(7)及び(8)から、本発明の大腸菌形質転換体により発現された組換え型GST-NS5Bt及び組換え型NS5Btのいずれも、RdRPに共通の性質(テンプレート及びプライマーの要求、 Mg^{2+} 依存性、及び至適反応条件等)を有する活性な可溶性タンパクであることが分かる。なお、本発明のGST-NS5Bt及びNS5Btは、ターミナルトランスフェラーゼ活性は示さない点で、従来の昆虫細胞で発現された組換え型NS5Bと、活性においても異なる。

【0051】

試験例1 GST-NS5Bt及びNS5Btの活性とアミノ酸配列との関係

様々なアミノ酸配列における変異体を作成し、変異がRdRP活性に及ぼす影響を検討した。

NS5Btの変異体としては、あらゆるRdRP間で高度に保存されている、HCV NS5BのGDDモチーフにおける置換変異体(NS5Bt-m1)、YRHRARにおける変異体(NS5Bt-m2)及びCGYRRCRにおける変異体(NS5Bt-m3)をデザインした(図1参照)。

これらの変異体は、GDDのVDD(配列番号1におけるアミノ酸番号317-317(HCV蛋白におけるアミノ酸番号2736-2738、以下同様))による置換、YRHRARのAAAAAA(500-505(2919-2924))による置換、及びCGYRRCRのAAAAAA(274-280(2693-2699))による置換変異体である。

これらの置換変異体をコードするDNAは、突然変異誘発用に設計されたプライマー、NS5BFor及びNS5BtRevを用いるオーバーラップエクステンションによるPCR突然変異誘発法により調製した(Yi, M.-K.ら, 1997, Virology. 231:119-129)。

【0052】

NS5BのC末端領域における置換変異体(NS5B-m4)は、NS5BForと以下の配列のNS5Bm4Revとをプライマーとして、PCRにより得た。

GCGGATCCTC ACCGGTTGGGG AGCAGGTAGAT GCCTACCCCGG AGAAGGTAGGA

GTAGGCACCA CAT

(NS5Bm4Rev)(配列番号11)

このNS5Bm4Revは、合成のBamHI部位を有しており、3'プライマーとして用いた。

NS5B-m4では、アミノ酸番号579及び582におけるL及びVがいずれもPに変換されている(図1参照)。

これら変異体の活性を測定し、結果を表4に示す。

【0053】

表4 GST-NS5Bt突然変異体のRdRP活性

【表4】

タンパク	取り込み(cpm)	%活性
GST-NS5Bt (20ng)	23007	100
GST-NS5Bt-m1 (20ng)	1281	5.6
(40ng)	2170	9.4
GST-NS5Bt-m2 (20ng)	992	4.3
(40ng)	1094	4.8
GST-NS5Bt-m3 (20ng)	1046	4.5
(40ng)	1035	4.4
-タンパク	922	4.0

【0054】

大腸菌形質転換体から回収したGST-NS5Btの変異体タンパクのうち、NS5Bt-m1はRdRP活性を全く示さなかった（表4参照）。この結果は、GST-NS5Bt又はNS5Btタンパクは、RNA合成活性にGDDモチ

ーフを必要とすることを示唆している。比較的塩基性残基の多いクラスターの置換変異体、NS5Bt-m2及びNS5Bt-m3も、全くRdRP活性を示さず、また、実施例1で得たGST-NS5Btと共存下で、そのRdRP活性を阻害しなかった(表4)。以上から、得られたRdRP活性がGST-NS5Bt由来であり、その活性にGDDモチーフが必須であることが分かる。

【0055】

試験例2 GST-NS5Btの哺乳動物細胞内での局在化

NS5BのC末端の21アミノ酸の欠失が、哺乳動物細胞におけるNS5Bの局在化に及ぼす影響を哺乳動物細胞(肝がん培養細胞系HLE細胞、及びHepG2細胞、非肝がん細胞COS1細胞)による一時的な(transient)発現系で検討した。

検出を容易にするために、緑色蛍光タンパク(green fluorescent protein, GFP)と、全長のNS5B、NS5Bt及びNS5B-m4との融合タンパクをコードする発現プラスミド構築した。これらのプラスミド、GFP単独をコードするプラスミドで哺乳動物細胞HLEを形質転換し、発現したタンパクの細胞内での局在を調べた。

【0056】

(1) GFPとの融合タンパクの哺乳動物細胞での発現のためのプラスミドの構築

pSG5UTPL (Lin, Y.ら、1997, J. Biol. Chem. 272:7132-7139; Murakami, S.ら、1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123)から調製した。

緑色蛍光タンパク(green fluorescent protein; GFP)のcDNAは、pHGFP-S65T (Clontech Co. Ltd.)をテンプレートとし、以下のプライマーを用いてPCRで調製した。

AAGATATCGC GGCCGCATGGT GAGCAAGGGCG AG (GFPNotFor) (配列番号12)

AAGGATCCGA ATTCTGTACA GCTCGTCCAT (GFPEcoRev) (配列番号13)

これらは、それぞれ、合成のEcoRV、NotI及びEcoRI部位を有している。合成EcoRV及びBamHI部位を有するDNA断片をEcoRV、BamHIで処理し、pSG5UTPLのEcoRI部位をKlenowフラグメントで平滑末端化した後、B

amHI消化したベクターに挿入し、pGFPを得た。このpGFPベクターを用いてもう1つの哺乳動物発現ベクターpNKFLAGを構築した。

【0057】

翻訳開始に関連した領域を有しFLAG-tag (標識) エピトープ配列をコードする配列をpFLAGHis/p53 (R. Roederから入手)から、以下に示すPCR法を用いて得た。このDNA断片を、以下の1組のプライマー:

ATGCGGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGAT (NKFLAGFor) (配列番号14)

CGGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCT (p53Rev) (配列番号15)

(これらは、それぞれ、合成のNotI部位、コンセンサス翻訳開始部位、及びBamHI部位を有する)を用い、PCRにより、pGFP NotI and BamHI ベクターに挿入し、pNKFLAG/p53を得た。

プラスミドpNKFLAGは、上記のごとく、EcoRI及びBamHI部位を用いて、p53インサートをマルチクローニングサイトに置換することにより、構築した。

これらのプラスミドpNKFLAG及びpGFPのEcoRI及びBamHI部位に、常法に従って、NS5BのDNAを挿入し、GFP-NS5B発現プラスミド(pGFP/NS5B)又はFLAG-標識-NS5Bの発現プラスミド(pNKFLAG/NS5B)を構築した。同様に、NS5Bt及びNS5B-m4をコードするDNAを挿入して、それぞれの発現プラスミドを構築した。

【0058】

(2) 哺乳動物細胞での発現

約 1×10^5 のHLE細胞をスライドグラス上にプレートし、Quadripermの顕微鏡スライド培養ウェル (microscope slide culture well) (Heraeus Co. Ltd.) に置き、その翌日、GFP-NS5B 発現プラスミド (pGFP/NS5B) 又はFLAG-標識-NS5Bの発現プラスミド (pNKFLAG/NS5B) でトランスフェクトした。PBSですすいだ後、細胞を1.5%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定した。次いで、100%冷メタノールで5分間、後一固定した。それらを-25℃で風乾し-80℃で保存した。GFP-融合タンパクはPBS中、0.0005% Evans Blueで対比染色して検出した。FLAG-標識タンパクを発現している試料は、

PBS中、0.5%BSAでブロックし、0.5%BSA含有PBSで希釈(1:330)した抗-FLAG M2抗体で一夜染色した。

【0059】

免疫染色は、標準的な手法により、吸収されたウサギ抗マウスIgG、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG、及びストレプトアビジン-FITC (Amersham 社)を用い、Evans Blueで対比染色することにより行った。

結果は、NIBA及びWIBフィルターを備えたBX-50蛍光顕微鏡(Olympus社)で観察し、デジタルプリンティング(Picrography 3000, Fuji Co. Ltd.)によって視覚化した。同様なGFP-融合タンパクのHLE細胞内での発現レベルは、抗-NS5B IgG及び抗-GFP-IgG (Clontech Co., Ltd.)を用いて、参考例1に記載の方法でウェスタンブロッティングにより、免疫学的に検出した。同様に、他の変異体NS5Bについても実験した。

【0060】

結果を図9に示す。図中、(A)は全長NS5B、(B)はGFP-NS5Bt、(C)はGFP-NS5B-m4、(D)はGFP単独の結果である。

図9から、GFP-NS5Bタンパクは、主として、細胞質核膜周囲に主に分布し、細胞質にも分散したが、GFP単独では、細胞質と核の両方に拡散して局在化することが分かる(図9A)。また、GFP-NS5Btタンパクは核に主に集積し、その局在化がC-末端領域の切断により大きく影響を受けたことが分かる(図9B)。図9に置いて、GFP-NS5Btの蛍光性の核内のシグナルは、大きい球形の不規則な形を持った数個のクラスターとして観察される。

【0061】

また、NS5BのC末端のアンカー領域の機能を損なうように設計された2つの置換変異を有するGFP-NS5B-m4も核に局在すると共に、一部、細胞質にも認められた(図9C)。同様の結果は他の哺乳動物細胞COS1細胞又はHepG2細胞でも認められた。以上の結果は、NS5BのC末端21個のアミノ酸領域がNS5Bタンパクの細胞下での局在化に重要な役割を果たし、膜上に固定するアンカーの役割を示すものと考えられた。

【0062】

【配列表】

【0063】

配列番号：1

配列の長さ：1773

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：Hepatitis C virus JK-1 (NS5B)

配列：

TCG	ATG	TCT	TAC	ACG	TGG	ACA	GGC	GCC	CTA	ATC	ACA	CCA	TGC	GCC	GCG	48
Ser	Met	Ser	Tyr	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Cys	Ala	Ala	
1				5					10						15	
GAG	GAG	AGC	AAG	CTG	CCC	ATC	AAT	CCG	TTG	AGC	AAC	TCT	TTG	CTG	CGT	96
Glu	Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Arg	
				20				25					30			
CAC	CAC	AAC	ATG	GTC	TAC	GCC	ACA	ACA	TCT	CGC	AGC	GCA	GGC	CTA	CGG	144
His	His	Asn	Met	Val	Tyr	Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Gly	Leu	Arg	
				35				40					45			
CAG	AAA	AAG	GTC	ACC	TTT	GAC	AGA	CTG	CAG	GTC	CCG	GAC	GAC	CAT	TAC	192
Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Pro	Asp	Asp	His	Tyr	
				50				55					60			
CGG	GAC	GTG	CTC	AAG	GAG	ATG	AAG	GCG	AAG	GCG	TCC	ACA	GTT	AAG	GCT	240
Arg	Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	
				65				70					75		80	
AAA	CTT	CTA	TCT	GTA	GAA	GAA	GCC	TGC	AAG	CTG	ACG	CCC	CCA	CAC	TGC	288
Lys	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Cys	Lys	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	

85	90	95	
GCC AGA TCC AAA TTT GGC TAT GGG GCG AAG GAC GTC CGG AAC CTA TCC			336
Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser			
100	105	110	
AGC AAG GCC GTT AAC CAC ATC CAC TCC GTG TGG AAG GAC TTG CTG GAA			384
Ser Lys Ala Val Asn His Ile His Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu			
115	120	125	
GAC ACT GAA ACA CCA ATT GAC ACT ACC ATC ATG GCA AAA AAT GAG GTC			432
Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val			
130	135	140	
TTC TGT GTT CAA CCA GAG AAA GGA GGC CGC AAG CCA GCC CGC CTT ATC			480
Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile			
145	150	155	160
GTA TTC CCA GAA CTT GGG GTT CGT GTG TGC GAG AAA ATG GCC CTT TAC			528
Val Phe Pro Glu Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr			
165	170	175	
GAC GTG GTC TCC ACT CTT CCT CAG GCC GTG ATG GGC TCC TCA TAC GGA			576
Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly			
180	185	190	
TTC CAG TAC TCT CCT GGG CAG CGG GTC GAG TTC CTG GTG AAT GCC TGG			624
Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp			
195	200	205	
AAA TCG AAG AAA AAC CCT ATG GGC TTC GCA TAT TGC ACC CGC TGT TTT			672
Lys Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ala Tyr Cys Thr Arg Cys Phe			
210	215	220	
GAC TCA ACG GTC ACT GAG AGT GAT ATC CGT GTT GAG GAG TCA ATT TAC			720
Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr			
225	230	235	240
CAA TGT TGT GAC TTG GCC CCC GAG GCC AGA CAG GTC ATA AGG TCG CTC			768

Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Val Ile Arg Ser Leu
245 250 255
ACG GAG CGG CTT TAT ATC GGG GGC CCC CTG ACT AAT TCA AAA GGG CAG 816
Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln
260 265 270
AAC TGC GGT TAT CGC CGG TGC CGC GCC AGC GGT GTG CTG ACG ACT AAC 864
Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Asn
275 280 285
TGC GGT AAT ACC CTC ACA TGT TAC TTG AAG GCC TCT GCA GCC TGT CGA 912
Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg
290 295 300
GCT GCA AAG CTC CAG GAC TGC ACG ATG CTC GTG TGC GGA GAC GAC CTT 960
Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu
305 310 315 320
GTC GTT ATC TGT GAA AGC GCG GGA ACC CAG GAG GAC GCG GCG AGC CTA 1008
Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu
325 330 335
CGA GTC TTC ACG GAG GCT ATG ACT AGG TAC TCT GCC CCC CCC GGG GAC 1056
Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp
340 335 350
CCG CCC CAA CCA GAA TAC GAC TTG GAG TTA ATA ACA TCA TGC TCC TCC 1104
Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser
355 360 365
AAC GTG TCG GTC GCG CAC GAC GCA TCT GGC AAG CGG GTG TAC TAC CTC 1152
Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu
370 375 380
ACT CGC GAC CCC ACC ACC CCC CTC GCG AGG GCA GCG TGG GAA ACA GCA 1200
Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala
385 390 395 400

AGA CAC ACT CCA GTA AAC TCC TGG CTA GGC AAC ATC ATC ATG TAC GCG 1248

Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala

405

410

415

CCC ACC CTG TGG GCA AGG ATG ATT CTG ATG ACC CAC TTC TTC TCC ATC 1296

Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile

420

425

430

CTT CTA GCT CAG GAG CAA CTT GAA AAA GCC CTG GGT TGT CAG ATC TAC 1344

Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Gly Cys Gln Ile Tyr

435

440

445

GGG GCC ACT TAC TTC ATT GAA CCA CTT GAC CTA CCT CAG ATC ATT CAG 1392

Gly Ala Thr Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln

450

455

460

CGA CTC CAC GGT CTT AGC GCA TTT TCA CTC CAC AGT TAC TCT CCA GGT 1440

Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly

465

470

475

480

GAA ATC AAT AGG GTG GCT TCA TGC CTC AGG AAA CTT GGG GTA CCA CCC 1488

Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro

485

490

495

TTG CGA GTC TGG AGA CAT CGG GCC AGA AGT GTC CGC GCT AAG CTA CTG 1536

Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu Leu

500

505

510

TCC CAG GGG GGG AGG GCC GCC ACT TGT GGC AAG TAC CTC TTC AAC TGG 1584

Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp

515

520

525

GCA GTG AGG ACC AAG CTT AAA CTC ACT CCA ATT CCG GCT GCG TCC CAG 1632

Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln

530

535

540

TTG GAC TTA TCC GGC TGG TTC GTT GCT GGT TAC AGC GGG GGA GAC ATA 1680

Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile

545	550	555	560
TAT CAC AGC CTG TCT CGT GCC CGA CCC CGC TGG TTC ATG TGG TGC CTA 1728			
Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu			
565	570	575	
CTC CTA CTT TCT GTA GGG GTA GGC ATC TAC CTG CTC CCC AAC CGG 1773			
Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg			
580	585	590	

【0064】

配列番号：2

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GGGAGCTCCA TGTCGATGTC TTACACGTGG ACA 33

【0065】

配列番号：3

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GGGTCGACCC GGTTGGGGAG CAGGTAGATG CC 32

【0066】

配列番号：4

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GGGTCGACGC GGGGTCGGGC ACGAGACAGG CT

32

【0067】

配列番号：5

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGGATCCAG ATCTACGGGG CCACTTA

27

【0068】

配列番号：6

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGAATTCAA GACAAAGGGA ATGGCCTAT

29

【0069】

配列番号：7

配列の長さ：82

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGAATTCGA AGACTTCCT TTTTTTTGT TTTTTTTTT TTCTTTTTT TTTTCTTT 60

TTTTCTTT TTTTTTTTT CT 82

【0070】

配列番号：8

配列の長さ：80

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGGATCCGA AGACGCCACC AAAGAAGGAA AAGGGAAAAA AAAAAACAA AGAAGAAAAA 60

AAAAAAAGG AAAAAAAGA 80

【0071】

配列番号：9

配列の長さ：80

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGAATTCGA AGACTTGGTG GCTCCATCTT AGCCCTAGTC ACGGCTAGCT GTGAAAGGTC 60

CGTGAGCCGC ATGACTGCAG 80

【0072】

配列番号：10

配列の長さ：67

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGGATCCCT TAAGACATGA TCTGCAGAGA GGCCAGTATC AGCACTCTCT GCAGTCATGC 60
GGCTCAC 67

【0073】

配列番号：11

配列の長さ：67

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GCGGATCCTC ACCGGTTGGG GAGCAGGTAG ATGCCTACCC CGGAGAAGGT AGGAGTAGGC 60
ACCACAT 67

【0074】

配列番号：12

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

AAGATATCGC GGCCGCATGG TGAGCAAGGG CGAG 34

【0075】

配列番号：13

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

AAGGATCCGA ATTCTTGTA AGCTCGTCCA T

31

【0076】

配列番号：14

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

ATGCGGCCGC CACCATGGAC TACAAAGACG AT

32

【0077】

配列番号：15

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

CGGGATCCTC AGTCTGAGTC AGGCCCTTCT

30

【0078】

配列番号：16

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GAATTCGAGC TCCGGTACCC CCGGGTCGAC GACGGATCC

39

【0079】

配列番号：17

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

GGATCCGTCG ACCCGGGGG TACCGGAGCT CCGAATC

37

【図面の簡単な説明】

【図1】 HCVのポリタンパク前駆体及びそのNS5Bタンパクの構造を示す模式図である。上段は、HCVのポリタンパク前駆体の構造を示す模式図、中段はNS5Bタンパクの疎水性プロフィル (Kyte and Doolittle)である。S O S U I プログラムで推定されたアンカー領域には陰影が付されている。下段は、様々なGST-NS5B融合タンパクの発現構築物の構造を示す模式図である。図中のアミノ酸番号は、HCVポリタンパク前駆体上のアミノ酸番号に対応する。NS5BはNS5Bの全アミノ酸を有し、NS5B t は、2989-3010の21アミノ酸が欠失されており、NS5B t -m1は、GDDモチーフがVDDで置換されており、NS5B t -m2及びNS5B t -m3は、塩基性残基のクラスターのアラニンによる置換を有し、NS5B -m4は推定のアンカー領域内に突然変異を有する。

【図2】 GST融合蛋白発現プラスミド、pGENKSの制限地図である。

【図3】 プラスミドpGENKSの構築の模式図である。トロンビンによる切断箇所は下線で示されている。

【図4】 大腸菌で発現されたGST-NS5B t の精製の各過程を示す図であり、Aは培養物から得たSDS-10%PAGEにより分離し、Coomassie 染色法 (CBB) で染色した結果の模写図である。レーン1は全細胞抽出液；レーン2は超音波処理物の遠心上清；レーン3はDEAE Sephacelに通した後の無細胞抽出液；レーン4はグルタチオンセファロース4Bカラムからの溶出液；レーン5はpoly (U) Sepharoseカラムからの溶出液；レーン6はトロンビン処理後の非-融合型rNS5B t を表す。Bは抗NS5B抗体を用いるウエスタンブロッティング、Cは抗GST抗体を用いるウエスタンブロッティングの結果の模写図である。

【図5】 UMP取り込みアッセイにおける精製GST-NS5B t のRdRP活性を示すグラフである。Aは、poly (A) 又はpoly (dA) をテンプレートとし、oligo (U)₁₄又はoligo (dT) をプライマーとして用い、[α -³²P]UMP又は[α -³²P]dTTPに対する基質特異性を調べた結果を示すグラフであり

、Bは25℃及び37℃での反応のタイムコースを示し、CはGST-NS5B tの量との関係を示すグラフである。.

【図6】 様々な反応条件下での精製GST-NS5B tのUMP取り込みに基づくRdRP活性を示すグラフである。図中、AはpH、Bは温度、CはKCl濃度とUMP取り込みとの関係を示す。

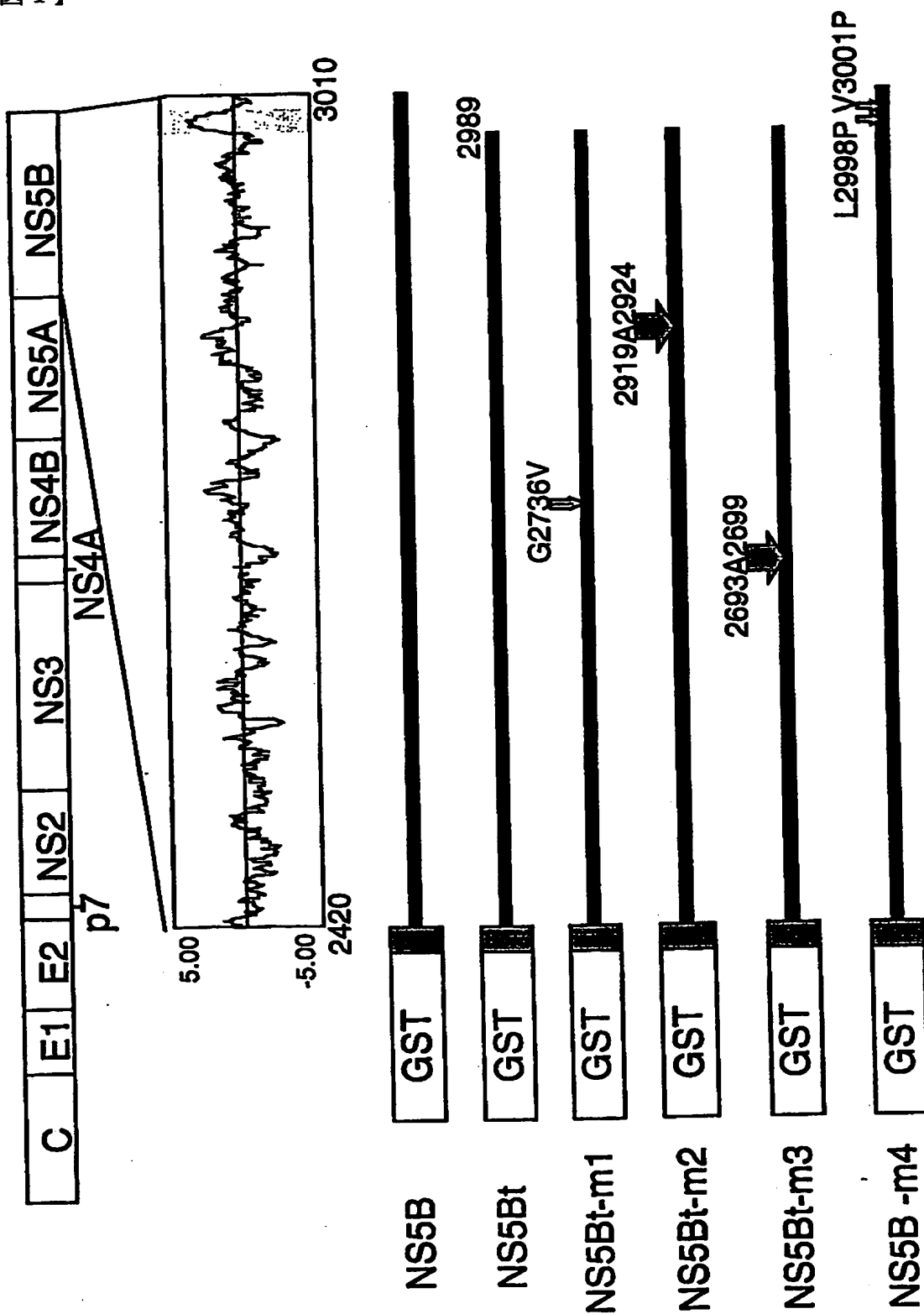
【図7】 様々な反応条件下での精製GST-NS5B tのUMP取り込みに基づくRdRP活性を示すグラフである。図中、Dは Mg^{2+} イオン、Eは Zn^{2+} 濃度(0、10、25及び50 μ M)とUMP取り込みとの関係を示す。

【図8】 試験管内で転写したRNAを用いるRNA合成アッセイの結果を示す図である。AはRNAテンプレートの構築模式図、Bは試験管内で転写したRNAをテンプレート及びプライマーとして用いて30℃で2時間反応させ、RNA生成物を有機溶媒で抽出した後、エタノール沈殿し、8M尿素含有8%PAGEで分離、精製し、得られた泳動パターンの模写図である。

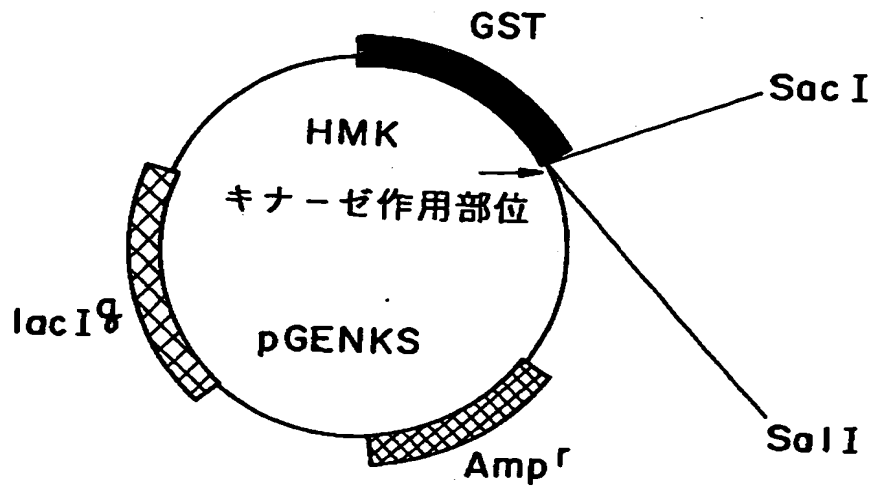
【図9】 哺乳動物細胞で発現させたNS5B tの局在化を示す顕微鏡写真の模写図である。(A)は全長NS5B、(B)はGFP-NS5B t、(C)はGFP-NS5B-m4、(D)はGFP単独を、コードする発現プラスミドでトランスフェクションされたHLEにおける発現産物の局在化を蛍光顕微鏡下で観察した結果を示している。

【書類名】 図面

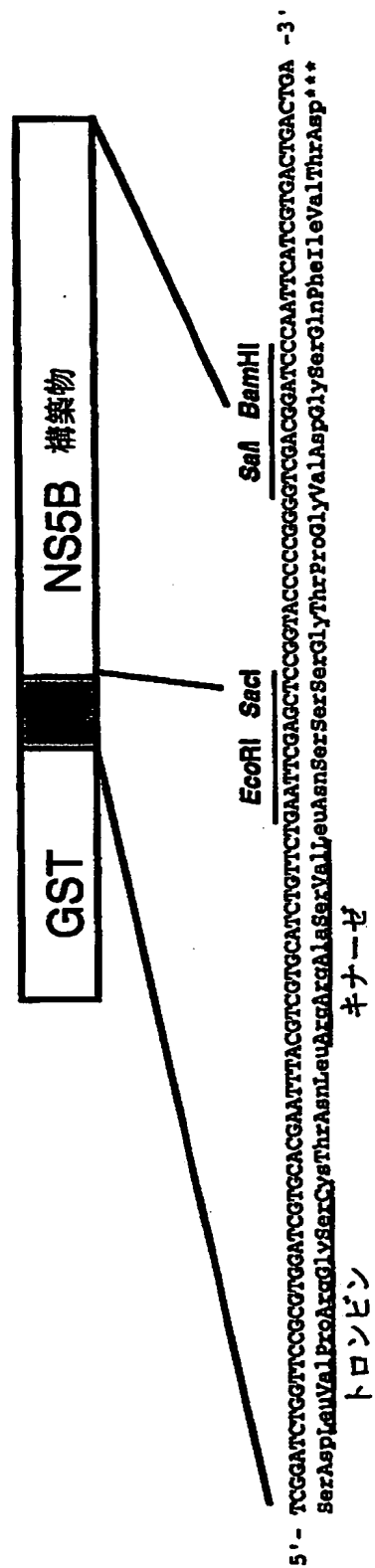
【図 1】



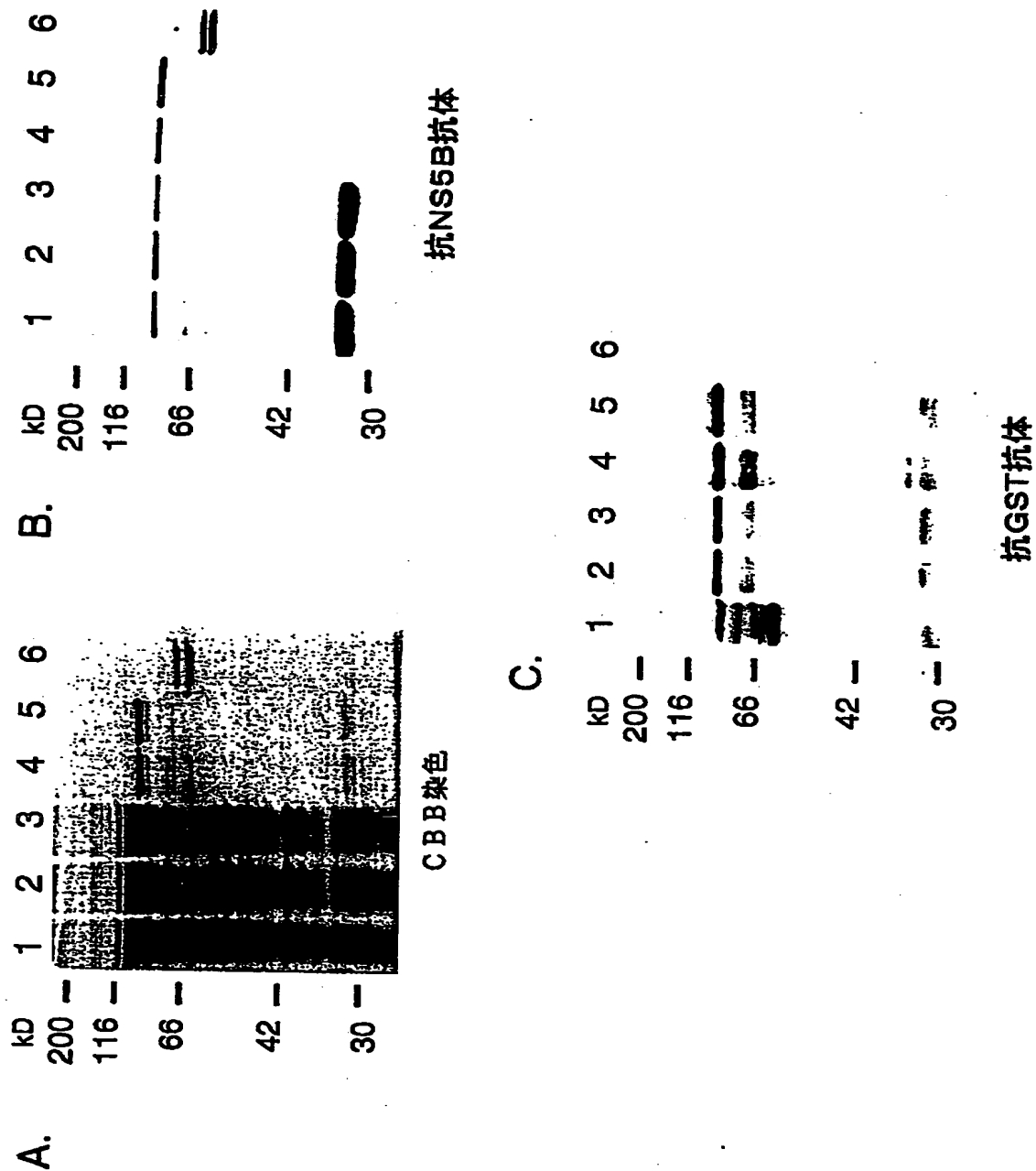
【図2】



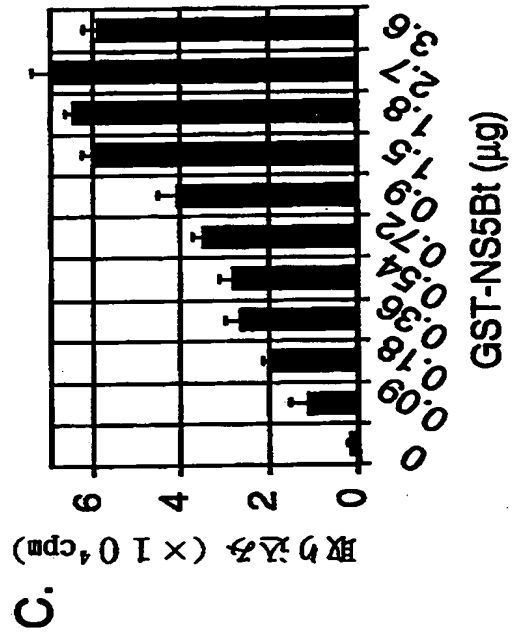
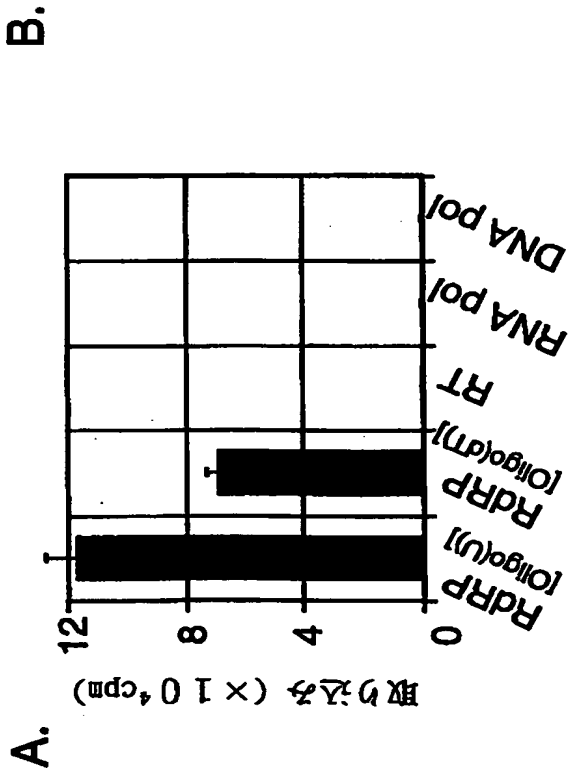
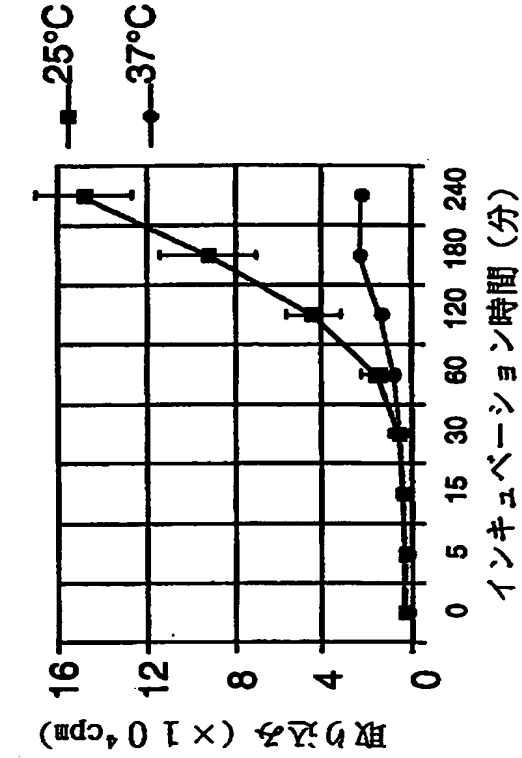
【図 3】



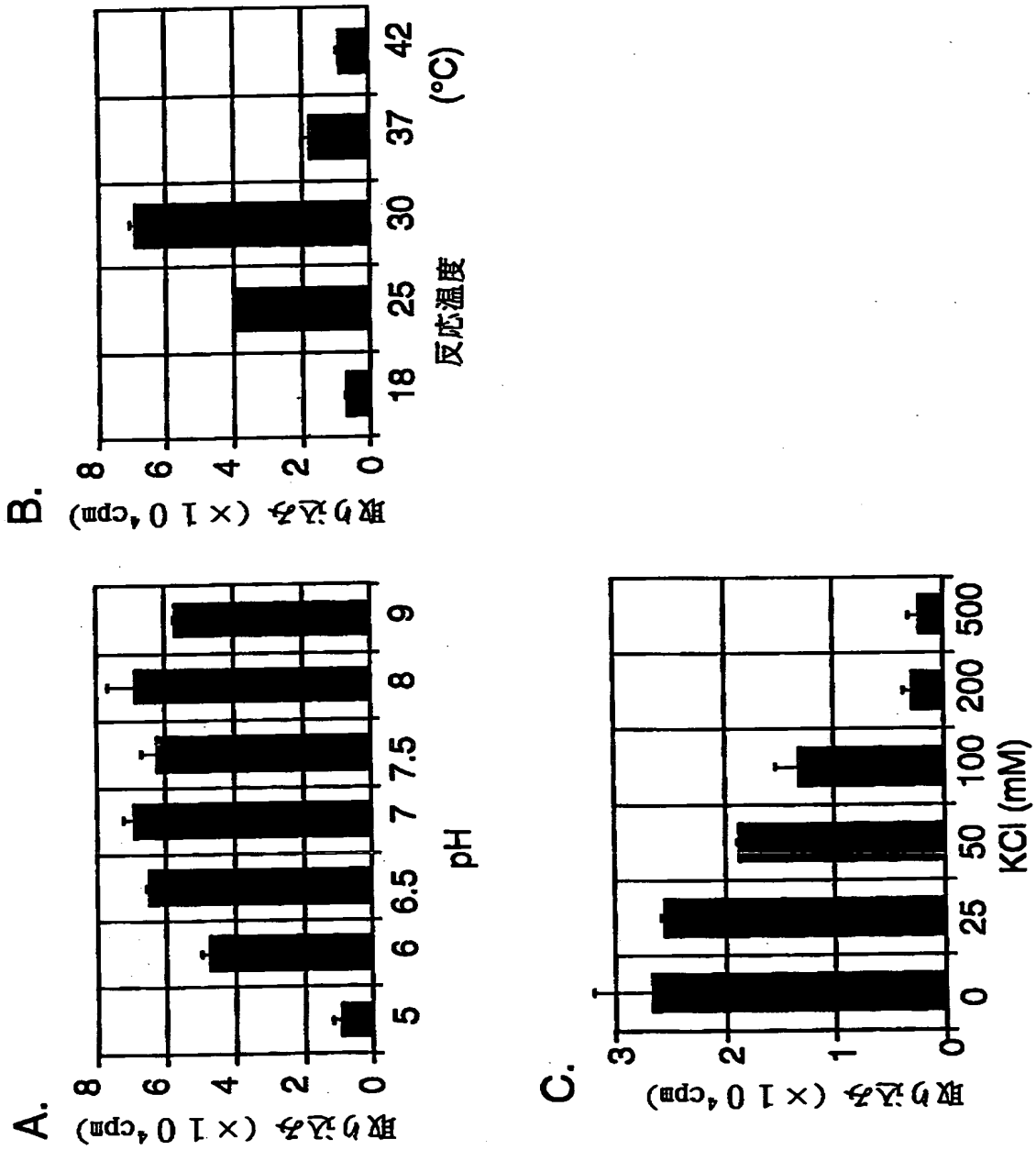
【図4】



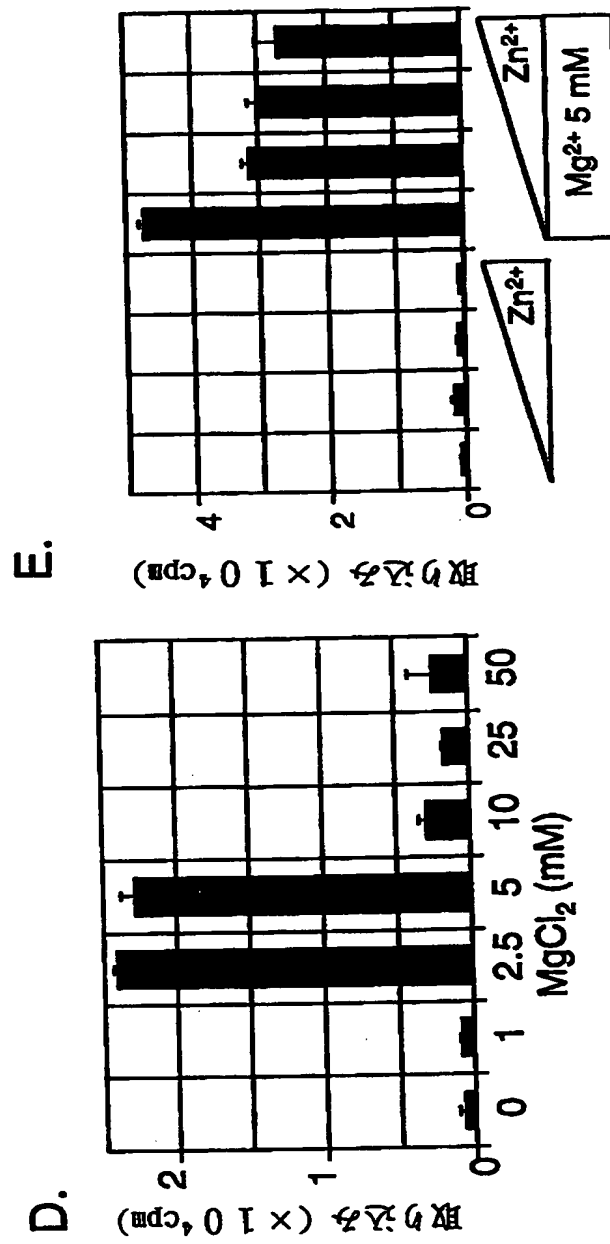
【図5】



【図6】



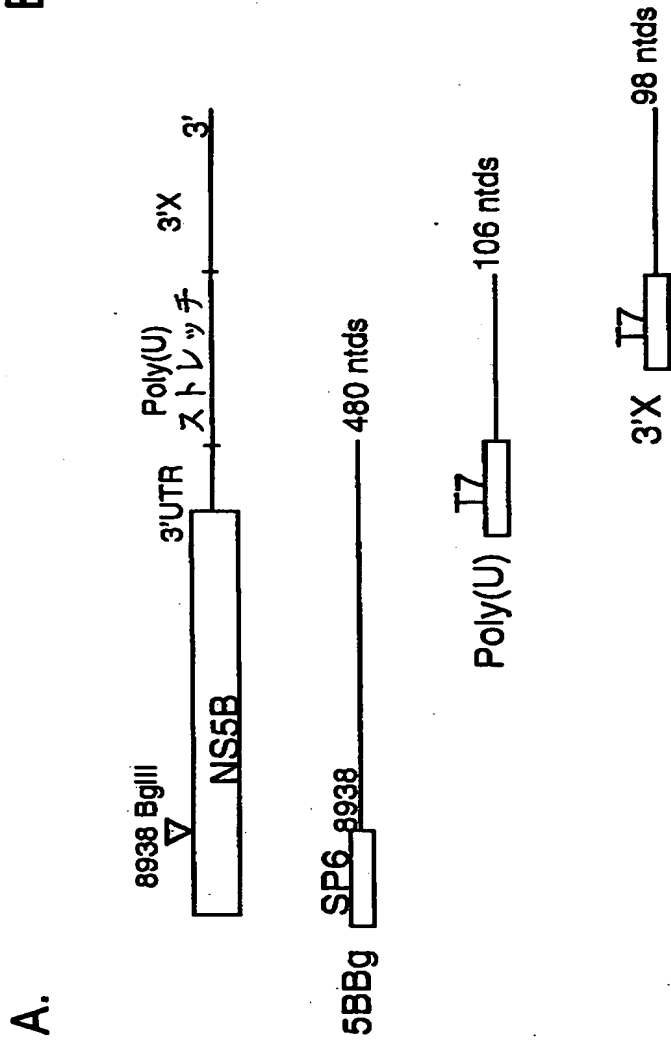
【図 7】



【図8】

5BBg
Poly(U)
3'X
コックロー

B.
MM
(ntds)

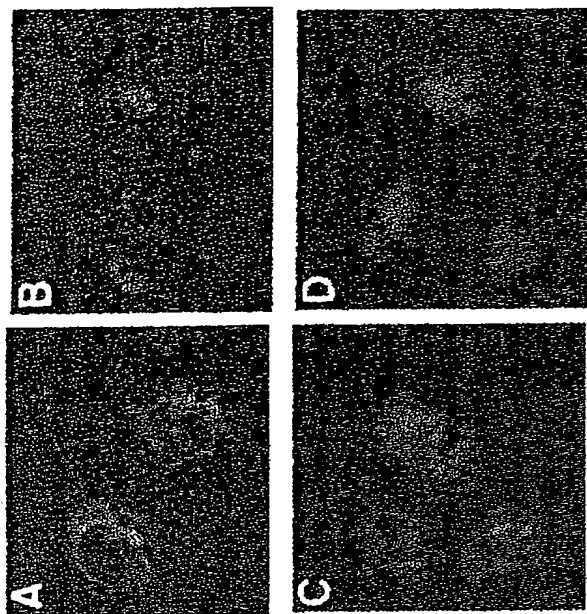


500 —

110 —

8M尿素8%PAGE

【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトC型肝炎の予防及び治療に有用な物質の開発

【解決手段】 HCVのRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRP）由来の、ポリメラーゼ活性を有する可溶型ポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド以外の第2のポリペプチドをコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地からポリメラーゼ活性を有する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RdRPの製造方法、及び該組換え型RdRP。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

590005922

【住所又は居所】

アメリカ合衆国 4 6 2 8 5 インディアナ州 インディアナポリス市、リリー・コーポレイト・センター（番地の表示なし）

【氏名又は名称】

イーライ・リリー・アンド・カンパニー

【代理人】

申請人

【識別番号】

100062144

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】

100068526

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】

100087114

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所

【氏名又は名称】

齋藤 みの里

特平10-047015

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [590005922]

1. 変更年月日 1990年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 アメリカ合衆国46285インディアナ州インディアナポリス
市、リリー・コーポレート・センター（番地の表示なし）

氏 名 イーライ・リリー・アンド・カンパニー